UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs669: A>G DEL GEN A2M EN DONADORES DEL HOSPITAL CIVIL "JUAN I. MENCHACA"

PRESENTA

Alexis Sayuri Suárez Villanueva

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jorge Peregrina Sandoval

ASESOR

Dra. Melva Gutiérrez Angulo



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-062/2010

C. Alexis Sayuri Suárez Villanueva PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción TESIS con el título "FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs669:A>G DEL GEN A2M EN DONADORES DEL HOSPITAL CIVIL "JUAN I. MENCHACA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como Directora de dicho trabajo al **Dr. Jorge Peregrina Sandoval** y como asesores al **Dra. Melva Gutiérrez Angulo.** Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE "PIENSAYTRABAJA"

"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana" Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jai., 07 de Julio del 2010.

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLOŘÍA PARADA BARRERA

SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias. Presidente del Comité de Titulación. Licenciatura en Biología. CUCBA. Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación. modalidad tesis opción tesis con el título: "FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO rs669: A>G DEL GEN A2M EN DONADORES DEL HOSPITAL CIVIL "JUAN I. MENCHACA"" que realizó la pasante Alexis Sayuri Suárez Villanueva con número de código 301765957 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Alexis Danvi Sante V.

Alexis Sayuri Suárez Villanueva Guadalajara, Jal., a 30 de junio de 2010

Jorge Peregrina Sandoval Director del trabajo thelia suffering -

Melva Gutiérrez Angulo Asesor

Nombre completo de los Sinedales asignados por el Comite de Titulación

Patricia Castro Félix

Cinthya Guadalupe Temores Ramírez

Salvador Velázquez Magaña

Supl. Verónica Palomera Avalos

Firma de aprobado

Eachaide anrahadan

300610

iscora Palomai(+

2010@12010

200

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mi mama (Lupe) y a mi papa (Chava) que me dieron la oportunidad de venir a Guadalajara a estudiar: sé el enorme esfuerzo que implico para todos el que yo estuviera aquí. Papi, gracias por quererme tanto y darme todo lo que he necesitado sin medida todo este tiempo y sobre todo por depositar toda tu confianza al dejarme venir. Mami, gracias por tu paciencia, compresión, empeño y fuerza, por estar siempre pendiente de mí y cuidarme.

A mis hermanos. Chiqui (tu sabes porque). Pacheco (no sé porque, ni te pareces, jajaja) gracias por llenar mi vida de cariño, ayuda y una que otra rabieta. Los quiero mucho aunque nunca lo diga.

Dr. Jorge gracias por aceptarme inicialmente en su laboratorio y el apoyo que me ha brindado. Dra. Melva por su disposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas, por sus sugerencias, correcciones y aportaciones proporcionadas a este trabajo. Dra. Luz por permitirme formar parte de este maravilloso equipo de trabajo. Para ellos tengo sólo palabras de agradecimiento, por su apoyo incondicional, por los momentos compartidos dentro y fuera del trabajo, mostrándome que son un pilar importante en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio (Miriam. Rodolfo y Ruth) por permítirme ayudar en sus respectivos trabajos, por sus asesorías, paciencia e innumerables respuestas a mis preguntas. En especial a José Miguel por ser mi tutor chiquito, por estar siempre a mi lado apoyándome y brindándome sus múltiples consejos y sugerencias, por su sincera y gran amistad la cual valoro mucho (espero algún día ya no ser tan enfadosa).

Cesar, gracias por permitirme formar parte de tu vida, por darme tu amor, apoyo y confianza, por aguantarme en mis momentos de crisis (espero no sean muchos), por compartir nuevos e inolvidables momentos en mi vida.... Te quiero mucho.

A Bicha, Pampa, Lilia, Soco y Karol, por ser unos amigos increíbles, con quienes he compartido momentos felices y tristes, siempre los llevare en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y alegría. Gracias por recordarme que todavía existen personas valiosas en este mundo.

SEDE

Instituto de Genética Humana "Dr. Enrique Corona Rivera", Laboratorio Genética y Cáncer del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara y Laboratorio de Inmunobiología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

ÍNDICE GENERAL

DESCRIPCIÓN	Página
ÏNDICE	11
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
I. ANTECEDENTES	1
I.1 Alfa 2-macroglobulina	1
1.2 Estructura de α-2m	1
1.3 Función de α-2m	2
L4 Síntesis de α-2m	4
I.5 α-2Mr	4
1.6 El gen A2M	4
1.7 Polimorfismo rs669: A>G	5
1.8 Variación genética	6
1.9 Equilibrio de Hardy-Weinberg	7
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
III PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	8
IV JUSTIFICACIÓN	9
V OBJETIVOS	10
V.1 Objetivo general	10
V.2 Objetivo particular	10
VEMATERIAL Y METODOS	11
VI.1 Tipo de estudio	11
VI.2 Tamaño de muestra	11
V1.3 Criterios de selección del grupo de estudio	11
VI.4 Estrategia metodológica	12
VI.5 Análisis estadístico	14
VI. 6 Consideraciones éticas	14

VII RESULTADOS	15
VIII DISCUSIÓN	18
IX PERSPECTIVAS	19
X LITERATURA CONSULTADA	20
XIANEXOS	24
XI.1 Consentimiento informado para individuos de población general	24
XL2 Técnicas de laboratorio	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
Fig. 1	Estructura de α -2m]
Fig. 2	Mecanismo de inhibición de α-2m	3
Fig. 3	Estructura del gen A2M y localización del polimorfismo rs669: A>G	5
Fig. 4	Clasificación de los SNP's	7
Fig. 5	Secuencia parcial del gen A2M	13
Fig. 6	Porcentaje de individuos de acuerdo al genero	15
Fig. 7	Producto de la digestión con la enzima Mbol para el polimorfismo rs:669 A>G	16

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Página
Cuadro 1	Frecuencia del polimorfismo rs669: A>G en diferentes poblaciones	6
Cuadro 2	Secuencia de iniciadores para A2M y tamaño del producto amplificado	12
Cuadro 3	Productos esperados una vez realizada la digestión enzimática	13
Cuadro 4	Frecuencias genotípicas y resultado de EHW	16
Cuadro 5	Frecuencias génicas	16
Cuadro 6	Genotipos obtenidos de acuerdo al género	t 7
Cuadro 7	Comparación de la distribución de genotipos de rs669; A>G con otras poblaciones	17

ABREVIATURAS

alfa-2-macroglobulina (proteína) α- 2m a- 2mR alfa-2-macroglobulina receptor Α Adenina A2MALFA-2-MACROGLOBULIN (gen) ADN Ácido desoxirribonneleico Biol Biólogo ٥٢ Grados centigrados CTAB Bromuro de hexadecil trimetil amonio Ð Amplitud total del intervalo de confianza dNTPs Desoxiribonucleótidos Trifosfatados DO Densidad óptica Dr Doctor Dra Doctora Doctor en Ciencias Dr. en C Doctora en Ciencias Dra. en C Bromuro de duodecil trimetil amonio DTAB Ácido etilenodiaminotetraacético EDTA Equilibrio Hardy Weinberg FHW G Guanina Gramos h Horas He Isoleucina Kilodalton kDa Ь Kilobase Μ Marcador de peso molecular Microgramos μе μL Microlitros Cloruro de Magnesio $MgCl_2$ Min Minutos

mL	Mililitros
mM	Milimolar
N	Tamaño de la muestra
NaC1	Cloruro de Sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
nın	Nanómetro
NH4HCO3	Bicarbonato de amonio
P	Estimado de la proporción a ser medida (alelos)
p*	Exacta de Fisher
Ph	Potencial de hidrógeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, del inglés
	restriction fragment lenght polymorphism
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TBE 10X	Buffer (Tris base 0.89M, EDTA 0.0025M, ácido bórico 0.89M)
TBE 1X	Buffer (Tris 10.8gr, EDTA 0.58gr, ácido bórico 5.5gr, agua bidestilada
	1000mL)
TE	Buffer (Tris Hel 10mM, EDTA 0.2 mM, pH 7.5)
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tris	Trisma base
Val	Valina
VIII	Virus de Inmunodeficiencia Humana
X^2	Prueba chi-cuadrada
Zerit	Valor estimado de Z

RESUMEN

Introducción: El gen A2M se localiza en 12p12.3, mide 48 kb y está constituido por 36 exones, codifica para la proteína alfa-2-macroglobulina (a-2m), su estructura primaria abarca 1451 aminoácidos y pesa 180 kDa. La proteína α-2m funciona como una trampa molecular inhibiendo la función de diversas proteasas. Se han descrito aproximadamente 15 variantes en la región codificadora del gen, dentro de las cuales se encuentra el polimorfismo rs669:A>G. Material v métodos: Se analizó un grupo constituido por 112 muestras de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento amplificado fue digerido con la enzima de restricción Mbol y mediante corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata, se realizó la identificación de los polimorfismos. El nivel de significancia fue considerado como p<0.05. Resultados y Discusión: Se genotipificaron 112 muestras de DNA para el polimorfismo rs669;A>G, 46 individuos presentaron genotipo (A/A), 56 (A/G) v 10 (G/G). Las frecuencias alélicas fueron 0.66 para el aleo A v 0.34 para G. El análisis de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs669:A>G se encontró en EHW con una p=0.2936. Nuestro resultado muestra una tendencia del alelo A en la población estudiada, similar a lo reportado en las poblaciones italiana, holandesa, húngara y china.

I. ANTECEDENTES

I.1. Alfa 2-macroglobulina

La superfamilia de las alfa macroglobulinas comprende inhibidores de proteasas y componentes del complemento. Dentro de los inhibidores de proteasas, la alfa-2-macroglobulina (α-2m) encontrada en la circulación de muchos vertebrados, es un inhibidor con amplia especificidad, pertenece a las glicoproteínas de alto peso molecular y es la más representativa de la superfamilia de las glicoproteínas thiol éster (Sottrup-Jensen, 1989a). Homólogos de α-2m se remontan a los artrópodos, por ejemplo, el cangrejo herradura (Limulus póliphemus), especie que apareció hace más de 550 millones de años. En humanos, se produce principalmente en hígado y se encuentra en grandes concentraciones en suero y en fluido cerebroespinal (Tayade et al., 2005; Saunders et al., 2003).

I.2. Estructura de α-2m

La proteína α-2m es un tetrámero, formado por dos pares de dímeros, cada uno de éstos integrado por dos monómeros unidos por puentes disulfuro. La estructura primaria abarca 1451 aminoácidos y pesa 180 kDa (Arnold *et al.*. 2006; Sottrup- Jensen *et al.*. 1984) (Fig. 1)

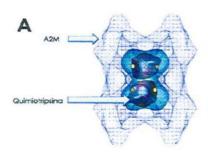
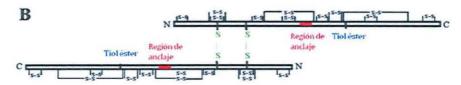


Figura1, A. Estructura tridimensional del complejo formado por α-2 macrglobulina-quimiotripsina. B. Dímero de α-2macroglobulina, la cadena polipeptídica se encuentra unida por dos puentes disulfuro en forma antiparalela, los dominios de la región de anclaje y tiol ester se encuentran cerca de la cavidad central de la estructura y el dominio de unión al receptor se encuentra en la región de la C-terminal de las subunidades (Kolodziej. et al. 2002)



En la estructura de la proteína existen múltiples sitios reactivos, lo que sugiere que tiene funciones diversas y complejas. Los sitios reactivos que han sido caracterizados son los siguientes (Borth, 1992):

- La región de anclaje: se encuentra localizada entre los residuos 666 706, es una región de 25 aminoácidos que puede ser hidrolizada por la mayoría de las proteinasas, va sean endógenas o exógenas como es el caso de algunos venenos.
- 2. Sitio tiol éster: este posee un enlace β-cisteinil-γ-glutamil intracatenario que se encuentra en el centro de una región muy conservada entre los residuos de aminoácidos 943 969. El puente formado entre Cisteinil y Glutamil es lábil y fácilmente escindible por el calor. Esta unión comenzó a ser estudiada en 1942, proponiéndose la posibilidad de que existieran puentes tiol éster en la estructura interna de las proteínas, y no fue hasta 40 años después que se identifica la estructura propuesta.
- 3. El sitio de unión del receptor: este sitio se encuentra en el extremo C-terminal, abarca 138 aminoácidos y es expresado cuando se rompe el enlace tiol éster. El receptor para q-2m ha sido identificado en fibroblastos, hepatocitos, astrocitos, adipocitos, sincitiotrofoblastos, monocitos y macrófagos.
- 4. El sitio reactivo transglutaminasa: está localizado cerca de la región de anclaje (aproximadamente 20 aminoácidos río arriba del sitio de rompimiento de la proteinasa) y es accesible en la molécula nativa

1.3. Función de a-2m

La función mejor estudiada de la proteína es su actividad inhibitoria de las cuatro clases de proteasas (serina, cisteína, metaloproteasas y proteínasas de aspártico) (Ashcom *et al.*, 1990; Strickland *et al.*, 1990; Lillis *et al.*, 2008). El mecanismo de inhibición es por un impedimento estérico llamado "Trampa Molecular" (Fig. 2). Las subunidades de a-2m contienen una región de anelaje central sensible a degradación por proteólisis. El

rompimiento de esta región por una proteasa induce un cambio conformacional en a-2m y como consecuencia el secuestro de la proteasa. Por lo tanto, el acceso de posibles sustratos al sitio reactivo de dichas proteasas es bloqueado. El cambio conformacional expone su dominio C-terminal permitiendo la unión a su receptor específico alfa-2 macroglobulina receptor (α -2mR). Además de la unión de la α -2m a proteasas, ésta se une por enlaces no covalentes a otras proteínas (Galliano et al., 2006; Feldman et al., 1985).

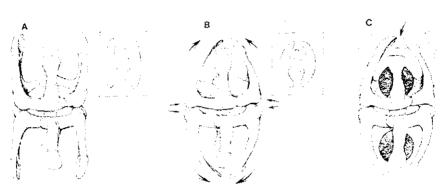


Figura 2: Modelo de a-2m (A) Molécula nativa acompañada por un esquema de la proyección en micrografía electrónica (Cuadro). (B) El cambio conformacional de la molécula con un esquema de micrografía electrónica (cuadro). Las flechas pequeñas indican el sirio de reconocimiento del receptor. (C) Captura de la proteasa por este inhibidor (Feldman et al., 1985).

Fisiológicamente la función más importante de α -2m en la circulación es probablemente la captura de endopeptidasas para ser inhibidas, debido a la extrema rapidez con la que los complejos enzima- α -2m son eliminados del plasma. De esta manera la proteina puede ayudar en la regulación de la actividad proteolítica extracelular, resultado de la coagulación y fibrinólisis, así como la liberación de proteasas de granulocitos y otras células proinflamatorias. Además de lo anterior, se ha sugerido que α -2m puede contribuir en las defensas del organismo contra patógenos invasores (Barret y Srtarkey, 1973).

1.4. Sintesis de a-2m

Numerosos linajes de células, incluidos los fibroblastos de pulmón, monocitos, macrófagos, hepatocitos y astrocitos, sintetizan α -2m (Zhang *et al.*, 2006). Algunas líneas de células tumorales son capaces de producir cantidades significativas de α -2m. Tal vez las diferencias cuantitativas en la síntesis de α -2m *in vivo* e *in vitro* más estudiadas son las de las células del melanoma. Estudios de Inmunohistoquímica de tumores primarios y metastásicos mostraron que aproximadamente el 33% de las células del melanoma expresan α -2m intracelular lo que sugiere la síntesis de α -2m por estas células (Borth, 1992).

I.5. a-2mR

El receptor para la proteína α-2m (α-2mR) es codificado por el cromosoma 12q13.1-13.3. (OMIM*107770) Es una glicoproteína de superficie celular de aproximadamente 600 kDa (contiene dos cadenas una pesada de 515 kDa y una liviana de 85 kDa) (Jenner *et al.*, 1998). Pertenece a la familia de receptores LDL (Low-density lipoproteín), la cual desempeña diversas funciones en varios procesos biológicos incluyendo el metabolismo de las lipoproteínas, degradación de proteasas, activación de enzimas lisosomales, y la entrada celular de toxinas bacterianas y virus (Lillis *et al.*, 2008). Este se encuentra en varios tipos de células incluyendo hepatocitos, monocitos, fibroblastos y macrófagos (Williams, 1992) y permite la rápida captación y degradación de α-2m *in vivo* e *in vitro*. (Gonzalez-Gronow *et al.*, 2006).

I.6. El gen A2M

El gen A2M se localiza en 12p12.3-13.3, tiene 48 kb, está constituido por 36 exones y codifica para la proteína α-2m (Poller et al., 1991). Se han descrito aproximadamente 15 variantes en la región codificadora del gen, Poller et al., (1992) identificaron el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs669: Δ>G (www.hgvs.org), el cual confiere un cambio en la proteína, substituyendo al aminoácido isoleucina ubicado en la posición 1000 por valina (Ile1000Val), este SNP se localiza en el exón 24 cerca del sitio thiol éster (Colaciceo et al., 2007: Poller et al., 1992) (Fig. 3). Aunque el efecto de este polimorfismo en la proteína aún no ha sido descrito se ha sugerido que la sustitución del aminoácido

isoleucina por valina ejerce cambios conformacionales en el sitio de unión de la proteína, impidiendo así, la función reguladora de α -2m sobre las proteasas.

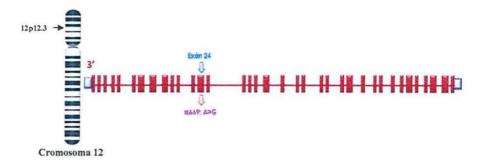


Figura 3: Estructura del gen A2M y localización del polimorfismo rs669: A>G

I.7. Polimorfismo rs669: A>G

Existen pocos estudios sobre la asociación del polimorfismo rs669: A>G con algún tipo de patología. Los únicos reportes corresponden a estudios de asociación realizados en pacientes con Alzheimer en las poblaciones china, italiana, holandesa y húngara (Bian et al., 2005; Zappia et al., 2004; Koster et al., 2000; Janka et al., 2002). Esta asociación ha sido reportada como significativa solo en las poblaciones china e italiana. El cuadro 1 muestra las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs669: A>G del gen A2M en las poblaciones mencionadas anteriormente. En cuanto a expresión génica, Tsavaris en un estudio realizado en pacientes con cáncer gástrico, no encontró diferencia significativa en los niveles de la proteína cuando comparo el grupo de pacientes con cáncer versus los controles sanos, mientras que Gonzalez-Gronow encontró una disminución significativa en los niveles de la proteína cuando realizó su estudio en suero de pacientes con cáncer de próstata. McDoniels-Silvers en su estudio comparó adenocarcinoma pulmonar y carcinoma de células escamosas con sus respectivos controles observando una disminución en la expresión de A2M. En contraste, células metastasicas de cáncer de colon producen y secretan grandes cantidades de RNAm de A2M, lo cual fue observado en un modelo experimental en ratas, a las cuales les fue inducido cáncer de colon (Smorenburg et al., 1996).

Cuadro 1. Frecuencia del polimorfismo rs669: A>G del gen A2M en diferentes poblaciones

				FRECUENCIAS %			Gpo.	
Población	N	A	G	A/A	A/G	G/G	Estudio	Referencia
							PG	Zappia et al., 2004
Sur de Italia	158	74	26	54	41	5		
							PG	Bian et al., 2005
Shanghai	200	92	8	85	14	1		
							PG	Janka et al., 2002
Húngara	51	72	28	49	45	6		
							PG	Koster et al., 2000
Holanda	358	67	33	44	45	11		

PG=Población General

I.8. Variación genética

Existe un gran número de variantes dispersas a través del genoma, las cuales pueden ser divididas en dos clases de acuerdo a la composición de los nucleótidos: variantes estructurales y variantes de nucleótido simple (Frazer et al., 2009), a este ultimo pertenecen, los SNP's (del inglés Single Nucleotide Polymorphism), los cuales son la clase que predomina dentro de la variación genética entre individuos. Este tipo de variaciones pueden estar localizadas a lo largo del gen en diversas regiones como pueden ser: la región promotora del gen (rSNP), (dichas variaciones confieren influencia a la actividad transcripcional del gen modulando la unión de los factores de transcripción); en intrones (iSNP) (modulando la estabilidad de las proteínas); en regiones codificantes como lo son exones (cSNP); en sitios de corte y empalme o en regiones intragénicas (gSNP). Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos o silenciosos (sSNP), los cuales no alteran la conformación del gen y los no sinónimos (nsSNP), localizados en regiones codificantes provocando cambios en el aminoácido afectando la función de la proteína (Checa, 2007) (Fig. 4).

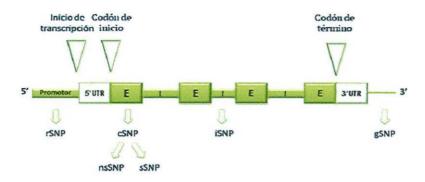


Figura 4: Clasificación de los SNP's de acuerdo con su localización en el genoma, modificado de Checa 2007

I.9. Equilibrio de Hardy-Weinberg

El uso de la prueba de Hardy-Weinberg es un enfoque genético fundamental para determinar si las frecuencias alélicas de un gen determinado en una población dada se mantiene de manera constante de una generación a la otra (Short et al., 2007).

Dicho modelo se resume en la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

En donde p y q son las frecuencias para los alelos dados en una población.

El cumplimiento de la ley Hardy-Weinberg es utilizado a menudo como un primer paso en estudios humanos. Es una pieza clave cuando se estudian asociaciones entre mutaciones genéticas y enfermedades. En estudios de casos y controles, los primeros sugieren una asociación entre la mutación y la enfermedad y los segundos, tienen como función representar a la población general; por lo tanto, la muestra de controles debe estar en EHW (Llorca et al., 2005).

IL PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enzimas proteolíticas juegan un papel importante en los procesos de progresión tumoral en diversas neoplasias, por lo que es importante el estudio de las proteínas reguladoras de proteasas y de los genes que les dan origen. Una de las principales proteínas inhibidoras de las proteasas es α-2m codificada por el gen Λ2M en el que se han descrito diversos polimorfismos, de los cuales rs669: A>G se encuentra cerca del sitio tiol ester, responsable de la actividad de la proteasa. Por lo que resulta de gran interés determinar la frecuencia del polimorfismo en muestras sanguíneas captadas en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan 1. Menchaca", esto nos permitirá en un futuro establecer asociaciones con el desarrollo y/o progresión de neoplasias frecuentes en nuestra población

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia del polimorfismo rs669; A>G del gen A2M en muestras captadas en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca"?

IV. JUSTIFICACIÓN

No existen estudios previos que muestren un panorama de distribución en la población de estudio, por lo que consideramos que los resultados derivados del presente trabajo, establecerán la distribución del polímortismo rs669: $\Delta > G$ en la población captada y servirán de base para posteriores estudios de asociación entre la presencia del polimortismo y diversas neoplasias.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Determinar si el polimorfismo rs669: A>G del gen A2M se encuentra en EHW en muestras captadas en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca".

V.2. Objetivos particulares

- Determinar la frecuencia alélicas y genotípicas del polimorfismo rs669: A>G del gen A2M en muestras captadas en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca".
- Establecer si el polimorfismo rs669: A>G del gen A2M se encuentra en EHW en la población general.
- 3. Comparar las frecuencias genotípicas obtenidas con las reportadas en otras poblaciones.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Tipo de estudio

Observacional, descriptivo y prospectivo.

VI.2 Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra se calculó utilizando la siguiente fórmula (Kish & Leslie 1965).

$$n = \frac{Z^2 p(1-p)}{D^2}$$

Zerit= Valor de Z (Corresponde al 95%).

p= Estimado de la proporción a ser medida (alelos).

D= Amplitud total del intervalo de confianza.

$$n = 1.96^{2} \cdot 0.50(1 - 0.50)$$
$$0.10^{2}$$

n= 96 individuos

La n corresponde a 96 individuos para el grupo de análisis. Se analizaron 112 muestras de DNA provenientes de individuos de la población general, captadas en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca". Las muestras forman parte del banco de DNA del laboratorio "Genética y Cáncer" del Instituto de Genética Humana "Dr. Enrique Corona Rivera" de la Universidad de Guadalajara

VI.3. Criterios de selección del grupo de estudio.

Criterios de Inclusión

Individuos originarios del estado de Jalisco de cualquier género y que al menos dos generaciones sean de Jalisco.

Criterios de exclusión

- Individuos que fueron recientemente transfundidos
- Individuos que fueron diagnosticados con VIII y/o hepatitis.

- Individuos con parientes de primer, segundo y tercer grado ya incluidos en el estudio
- Individuos que no firmen una carta de consentimiento informado

Criterios de eliminación

Muestras de DNA degradadas o insuficientes para establecer el genotipo

VI.4. Estrategia metodológica

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de sangre periférica se utilizó el método de Miller y cols. (1988) combinado con un micrométodo (Gustincich *et al.*1991). El procedimiento general fue el siguiente: primero se destruyeron las células con buffer de lisis para eritrocitos y leucocitos, después se utilizó cloroformo para desnaturalizar las proteínas. El DNA se precípitó con la sal CTAB y agua, una vez que se obtuvo el DNA se lavó con etanol. Finalmente se disolvió el DNA en buffer TE.

Cuantificación del DNA

El DNA se cuantificó por espectrofotometria a 260 nm para determinar su cantidad. La presencia de proteínas se evaluó a 280 nm, esto permite determinar la pureza de la muestra. Posteriormente se hicicron alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Amplificación génica

Una vez realizada la extracción de DNA se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el fragmento de A2M seleccionado en el estudio. La secuencia de los iniciadores así como el tamaño del producto amplificado se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores para A2M y tamaño de producto amplificado (Zappia M. et al 2004)

Gen	Polimerfismo	Iniciadores	Producto		
			amplificado		
A2M	rs669: A>G	F 5'- GGAGACATATTAGGCTCTGC -'3	245pb		
		R 5'- CTGAAACCTACTGGGAAATCC -			
		-3			

Digestión enzimática

Para la identificación del polimorfismo se realizó digestión enzimática utilizando la técnica de RFLP's (Restriction Ffragment Lenght Polymorphisms) con la enzima de restricción Mbol. La digestión enzimática se realizó a 37°C durante 16 h. El polimorfismo Val elimina el sitio de restricción de la enzima. El cuadro 3 muestra la enzima de restricción empleada y los fragmentos esperados. La ubicación de los iniciadores y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Mbol en el exón 24 del gen A2M se muestra en la figura 5.

Cuadro 3. Productos esperados una vez realizada la digestión enzimática con la enzima de restricción MboI para el polimorfismo rs669: A>G.

Gen	Polimorfismo	Enzima de restricción	Fragmentos esperados
A2M	rs669: A>G	MboI	Homocigoto mutado 245
			Heterocigoto 245,143,102
			Homocigoto silvestre 143,102

Secuencia de reconocimiento y corte de la enzima de restricción MboI

Figura 5. Secuencia parcial del gen A2M donde se localizan los iniciadores empleados en la PCR (amarillo) y el sitio de reconocimiento de la enzima Mbol (Verde). Él sitio polimórfico se muestra en rojo.

Electroforesis

Los fragmentos obtenidos se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% con una proporción acrilamida-bisacrilamida 29:1. La tinción se realizó con nitrato de plata.

VI.5. Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas se estimaron por el método de conteo y el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de Chi-cuadrada (χ^2) y en el programa de Arlequin v11.0. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando la p fue menor a 0.05.

VI.6. Consideraciones éticas.

De acuerdo al título quinto artículo 100 de la Ley General de Salud en lo que refiere a "Investigación para la salud", todos los individuos fueron informados sobre los objetivos del estudio así como del riesgo mínimo que implica la toma de sangre periférica. Una vez que aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo I). En todo momento se mantendrá la confidencialidad de los datos personales así como de los resultados producto de este proyecto.

VII. RESULTADOS

Descripción general

Se analizaron 112 individuos de población general de origen jalisciense, remitidos al Banco de Sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Juan I. Menchaca" como donadores de sangre, los cuales se encontraban con un rango de edad de 30 a 40 años. La proporción de género fue 24% femenino y 76% masculino (Figura 6).

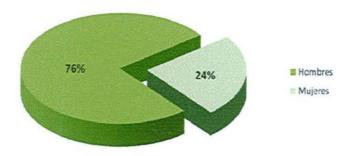


Figura 6. Porcentaje de individuos de acuerdo al género

Los genotipos obtenidos del polimorfismo rs669: A>G fueron 46 individuos con genotipo silvestre (A/A), 56 con genotipo heterocigoto (A/G) y 10 con genotipo polimórfico (G/G). Las frecuencias genotípicas se describen en el cuadro 5. Algunos genotipos observados se muestran en el gel de la figura 7.

Las frecuencias alélicas fueron 0.66 para A y 0.34 para G (Cuadro 4). El análisis de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs669: A>G estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg con una p = 0.2936 (Cuadro 5) con una proporción de heterocigotos esperados de 0.45 versus 0.50 de heterocigotos observados.

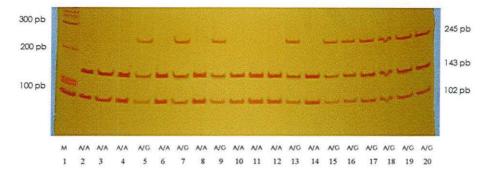


Figura 7. Producto de la digestión con la enzima MboI para el polimorfismo rs:669 A>G. Gel de acrilamida al 6% (29:1) teñido con nitrato de plata. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2-3,5,7,9-11,13 homocigoto (AA), carriles 4,6,8,12,14-19 heterocigotos (AG)

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas obtenidas de 112 individuos para el polimorfismo rs669: A>G y resultado del Equilibrio de Hardy-Weinberg.

		Observados Esper				
		n=112	%	n=112	%	
Genotipos	A/A	46	41	49	44	
	A/G	56	50	50	45	
	G/G	10	9	13	11	
	EHW *		p=().2936		

^{*}Chi-cuadrada

Cuadro 5. Frecuencias génicas obtenidas de 112 individuos para el polimorfismo rs669: A>G

	Frecuencias	génicas para rs66	9: A>G	
		N	%	
Alelos	A	148	66	
	G	76	34	

El análisis de los genotipos estratificados por género no mostró diferencias significativas p < .05 (Cuadro 6)

Cuadro 6. Genotipos obtenidos de acuerdo al género para el polimorfismo rs669; A>G

	Hon	ibres	Mu	jeres	p*
Genotipos	N	%	N	%	
A/A	35	41	11	41	
A/G	43	51	13	48	0.05
G/G	7	8	3	11	

^{*}Exacta de Fisher

Comparación poblacional

Las frecuencias genotípicas encontradas en este estudio se compararon con las frecuencias descritas en las poblaciones italiana, china, húngara y holandesa, se encontraron diferencias significativas únicamente con la población china con una p = 0.0000 (Cuadro 7).

Cuadro7. Comparación de la distribución de genotipos de rs669: A>G en donadores del hospital civil "Juana I. Menchaca" con otras poblaciones.

Referencia	Población	N	Fre	cuencias (%)	<i>p</i> *
			AA	AG	GG	
Zappia et al., 2004	Italiana	158	54	41	5	0.0940
Bian et al., 2005	China	200	85	14	1	0.0000
Janka et al., 2002	Húngara	51	49	45	6	0.6153
Koster et al., 2000	Holandesa	358	44	45	11	0.6175
Este estudio	Jalisciense	112	41	50	9	Referencia

^{*}Chi-cuadrada o Exacta de Fisher

VIII. DISCUSIÓN.

Este estudio describe las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs669: A>G en muestras sanguíneas captadas en el banco de sangre del Hospital Civil de Guadalajara "Dr. Juan I. Menchaca" Nuestros resultados muestran una tendencia del alelo A en población general similar a lo reportado en las poblaciones Italiana, holandesa, húngara y china. Este resultado es influido por un incremento en la frecuencia del genotipo heterocigoto A/G (50%). Sin embargo, en la población china el incremento del alelo A está determinado por el genotipo homocigoto A/A (85%). El análisis comparativo de las frecuencias genotípicas entre las diferentes poblaciones mostró diferencias significativas únicamente con la población china. Estas diferencias pueden ser explicadas por el componente genético de la población jalisciense, demostrado por estudios poblacionales realizados por Salazar-Flores et al., 2009 y Rubí-Castellanos et al., 2009. Ellos concluyen que la población jalisciense y en general la población mexicana está conformada principalmente por origenes ancestrales europeos, amerindio y en menor proporción africano.

Este es el primer estudio en población mexicana donde se describen las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs669: A>G. Además, se demostró que dicho polimorfismo está en EHW, lo que permite que pueda ser utilizado para estudios de asociación.

Existen algunos estudios sobre la asociación del polimorfismo rs669: A>G con Alzheimer en población china, italiana, holandesa y húngara (Bian et al., 2005; Zappia et al., 2004; Koster et al., 2000; Janka et al., 2002). Esta asociación se ha encontrado significativa solo en población china e italiana.

IX. PERSPECTIVAS

El presente trabajo forma parte de un estudio en el cual se analiza el polimorfismo rs669: A>G del gen A2M en donadores del hospital civil "Jua I. Menchaca". Los resultados obtenidos serán utilizados como grupo de referencia para determinar la asociación entre la presencia del polimorfismo en A2M y el desarrollo de metástasis en diversas neoplasias. Al determinar que la población en estudio se encuentra en equilibrio, nos permitirá proseguir con el análisis del polimorfismo en la población de pacientes con cáncer colorrectal.

X. LITERATURA CITADA

- Arnold JN, Wallis R, Willis AC, Harvey DJ, Royle L, Dwek RA, Rudd PM, Sim RB. 2006. Interaction of mannan binding lectin with alpha macroglobulin via exposed oligomannose glycans: a conserved feature of the thiol ester protein family?, J Biol Chem, 281:6955-6963.
- Ashcom JD, Tiller SE, Dickerson K, Cravens JL, Argraves WS, Strickland DK, 1990. The human alpha 2-macroglobulin teceptor: identification pf 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. J Cell Biol. 110:1041-1048.
- Barrett AJ, Starkey PH. 1973. The interaction of α₂-macroglobulin with proteinases; characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism, J. Biochem, 133:709-724
- Bian L, Yang DJ, Guo TW, Duan Y, Qin W, Sun Y, Feng GY, He L. 2005. Association study of the A2M and LRP1 genes with alzheimer disease in the han chinese. Biol Psichiatry, 58:731-737.
- Borth W. 1992, α₂-Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. The FASEB Journal, 6:3345-3353.
- Checa MA. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Revista del Instituto Nacional Enfermedades Respiratorias de México, 20:213-221
- Colacicco AM, Solfrizzi V, D'Introno A, Capurso C, Kehoe PG, Seripa D, Pilotto A, Santamato A, Capurso A, Panza F 2007. Alpha-2-macroglobulin gene, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 locus, and sporadic Alzheimer's disease. Eur Neurobiology, 47:209-213
- Frazer AK, Murray SS, Schork NJ, Topol JE, 2009, Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nature reviews genetics, 10: 241-251
- Feldman SR, Gonías SL. Pizzo SV. 1985. Model of α₂ -macroglobulin structure and fuction. Biochemistry, 82:5700-5704
- Galliano MF, Toulza E, Gallinaro H, Jonea N, Ishida YA, Serre G, Guerrin M. 2006. A Novel Preotease Inhibitor of the α₂-Macroglobulin family expressed in the human epidermis. The Journal of Biological Chemistry, 281:5780-5789.
- García Pérez HM. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida; fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnostico, 1:31-41.
- Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Govind G, Pizzo SV, 2006. Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. Cancer Research, 66:11424-11431
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Caminci P. 1991. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 11:298-302
- Horatis R. Den D. Antonarakis S. May 06, 2009. Human genome variation society. Recuperado el 27 de Abril de 2010, de http://hgvs.org/mutnomen/disc.htlm#SNP.

- Janka Z. Juhász A. Rimanoczy A. Boda K. Márki-Zay J. Palotás M. Kuk I. Z. 2002. Alpha2-macroglobulin exón 24 (Val-1000-Ile) polymorphism is not associated with late-onset sporadic alzheimer's dementia in the hungarian population. Psychiatr Genet. 12:49-54.
- Jenner L, Husted L, Thirup S, Sottrup JL, Nyborg J, 1998. Crystal structure of the receptor-binding domain of crystal structure of the receptor-binding domain of α₂-macroglobulin. Structure, 6:595-604.
- Kish L. Survey Sampling, John Wiley & Sons, NY, 1965.
- Kolodziej SJ, Wagenknecht T, Strickland DK, Stoops JK, 2002. The three-dimensional structure of the human alpha 2-macroglobulin dimer reveals its structural organization in the tetrameric native and chymotrypsin alpha-2-macroglobulin complexes. J Bio Chem, 277:28031-28037.
- Koster MN, Dermaut B, Crusts M, Houwing-Duistermaat JJ, Roks G, Tol J, Ott A, Hofman A, Munteanu G, Breteler MMB. Van Duijn CM, van Broeckhoven C, 2000. The α₂-Macroglobulin gene in AD: A population-based study and meta-analysis. Neurology, 55:678-684.
- Ley General de Salud, Titulo Quinto en materia de Investigación para la Salud, capítulo único, artículo 100, fracción III y IV. Últimas reformas publicadas DOF 24-02-2005, Pp 36.
- Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK, 2008, LDL receptor-related protein 1: uniquese tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. Physiol Rev. 88:887-918.
- Llorca J, Prieto Salceda D, Combarros O, Dierssen Sotos T, Berciano J, 2005 Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. Gae Sanit, 19:321-324.
- McDoniels Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M, 2002. Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res. 8:1127-1138.
- Miller SA, Dykes DD. Polesky HF. 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16:1245.
- Nakashima H, Akahoshi M, Tanaka Y. 2003. Capitulo 46, mutation detection using RT-PCR-RFLP Methods in molecular biology. Barlett-John MS y Stirling D, PCR protocols, segunda edición, Editorial Humana Press. 319-322.
- Online Mendelian Inherance in Man OMIM (TM), Johns Hopkins university, Baltimore, MD, MIM Number: 107770: 06/03/2009;, World Wide Web URL; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
- Potler W, Faber JP, Olek K. 1991. Sequence polymorphism in the human alpha-macroglobulin (A2M) gene. Nucleic Acids Res. 19:198.
- Poller W, Faber JP, Klobeck G, Olek K, 1992. Cloning of the human alpha 2-macroglobulin gene and detections in the two functional domains: the bait region and the thiolester site. Human Genet. 88:313-319.
- Rubi-Castellanos R, Martinez-Cortes G, Muñoz-Valle J, González-Martinez A, Cerda-Flores R, Anaya-Palafox M, Rangel-Villalobos H, 2009. Pre-Hispanic mesoamerican demography approximates

- the presents-day ancestry of mestizos throughout the territory of méxico. American Journal of physical Anthropology, 139:284-294
- Salazar-Flores J. Dondiego-Aldape R. Anaya-Palafox M. Muñoz-Arana I. Canseco-Ávila LM. Flores-Flores G. Morales-Vallejo ME, Barajas-Pérez N. Muñoz-Valle JF, Campos-Gutierrez R. Rangel Villalobos. 2009. Population structure and paternal admixture landscaoe on present-day mexican-mestizos revealed by Y_STR haplotypes. American Journal of Human Biology, 00:00-00.
- Sambrock J, Russel DW. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición.
- Saunders AJ, Bertram L, Mullin k, Sampson AJ, Latifzai K, Basu S, Jones J, Kinney D, MacKenzie-Ingano L, Yu S, Albert MS, Moscarillo TJ, Go RC, Bassett SS, Daly MJ, Laird NM, Wang X, Velicelebi G, Wanger SL, Becker DK, Tanzi RE, Blacker D. 2003. Genetic association of Alzheimer's disease with multiple polymorphisms in alpha-2-macroglobulin. Human Mol Genetic 12:2765-2776.
- Short AD, Kennedy LJ, Barnes A, Fretwell N, Jones C, Thomson W, Ollier WE, 2007. Hardy Weinberg expectations in canine breeds; implications for genetic studies, 98:445-451.
- Smorenburg SM, Griffini P, Tiggelman AB, Moorman AF, Boers W, Van Noorden JF, 1996. Alpha2-Macroglobulin is mainly produced by cancer cells and not by hepatocytes in rats with colon carcinoma metastases in liver. Hepatology, 23:560-570.
- Sottrup-Jensen L. Stepannik TM, Kristensen T, Wierzbicki DM, Jones CM, Lonbland PB, Magnusson S, Petersen TE, 1984. Primary structure of human alpha. 2-macroglobulin, V. The complete structure. J Biol Chem. 259:8318-8327.
- Sottrup-Jensen L. 1989. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation, J boil Chem. 264:11539-11542.
- Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS, 1990. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low densyity lipoprotein receptorrelated pretein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J Biol Chem. 265:17401-17404
- Tayade C, Esadeg S, Fang y, Croy BA, 2005. Functions of alpha 2 macroglobulins in pregnancy. Mol Cell Endocrinol, 245:60-66.
- Tsavaris N, Kosmas C, Kopterides P, Tsikalakis D, Skopelitis H, Sakelaridi F, Papadoniou N, Tzivras M, Balastos V, Koufos C, Archimandristis A. 2005. Retinol-binding protein, acute phase reactants and helicobacter pylori infection in patients with gastric adenocarcinoma. World J Gastroenterolology, 11:7174-7178.
- Tracey M. 2001. Short tandem repeat-based identification of individuals and parents. Croat Med. 42:233-238.

- Williams SE, Ashcom JD, Argraves WS, Strickland DK. A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein, J Bio Chem, 267:9035-40.
- Zappia M, Manna I, Serra P, Cittadella R, Andreoli V, La Russa A, Annesi F, Spadafora P, Romeo N, Nicoletti G, Messina D, Gambardella A, Quattrone A. 2004. Increased risk for Alzheimer disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms. Arch Neurol, 61:341-344.
- Zhang Y, Ge G, Greenspan DS, 2006. Inhibition of bone morphogenetic protein 1 by native and altered forms of α -2-macroglobulin. The journal of biological chemistry, 281:39096-39104.

XI. ANEXOS

XI.1. CONSENTIMIENTO INFORMADO POBLACIÓN GENERAL

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA "DR. ENRIQUE CORONA RIVERA" CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD UNVERSIDAD DE GUADALAJARA

CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Por medio de la presente autorizo a la Dra, en C. Melva Gutiérrez Angulo, a la Biol, Miriam Partida Pérez o a la Dra, en C. Maria de la Luz Ayala Madrigal a extraer 5 ml sangre periférica. La toma de muestra es para la realización del proyecto titulado:

"Frecuencia del polimorfismo C3435T del gen MDRI en población del occidente de México"

- 1- He sido informado (a) acerca del proyecto cuyo Investigador responsable es la Dra. Melva Gutiérrez Angulo y he sido invitado (a) a participar en el mismo, aportando información y una muestra de sangre de mi persona.
- 2- Entiendo que el procedimiento para la toma de muestra representa molestias y que exige un riesgo mínimo de daño físico para mi persona.
- 3- Acepto que no recibiré compensación alguna por lo cual libero a los investigadores y a las instituciones participantes de toda obligación económica para conmigo.
- 4- Autorizo a los investigadores mencionados a realizar los procedimientos de laboratorio convenientes al proyecto, incluidos estudios de DNA así como otros relacionados con el mismo y a hacer ser uso de las muestras y la información con fines científicos, docentes y estadísticos, siempre y cuando se haga en el marco de la ética profesional y se guarde la confidencialidad de los mismos.
- 5- Mi participación en este proyecto es voluntaria y puede terminar en el momento en que yo asi lo decida y lo exprese a los investigadores responsables.
- 6- Yo puedo localizarlos en el teléfono (01-33) 10585200, extensión 3646.

Nombre y firma del paciente

Nombre del testigo	Nombre del testigo
Fecha	Focha

NOTA: En la presente tesis se utilizaron las muestras que se tomaron en el proyecto "Frecuencia del polimorfismo C3435T del gen MDRI en población del occidente de México" ya que con este proyecto se formó el banco de DNA de población general y de acuerdo al punto #4 se nos autoriza para utilizar las muestras con fines de investigación. Por esta razón se muestra el consentimiento informado que se utilizó para la captación de dichas muestras, aunque el título no corresponda a este proyecto.

XI.2. TECNICAS DE LABORATORIO

Extracción de DNA

Fundamento: Existen diferentes protocolos para la extracción de ácidos nucleicos. La mayoria se caracterizan por el empleo de detergentes y solventes orgánicos que lisan los núcleos de las células y remueven las proteinas adheridas al DNA, seguidos por la precipitación de este con etanol. En el presente estudio se utilizó el metodo de Miller y cols. (1988) combinado con un micrométodo. (Gustincich *et al.* 1991; Miller *et al.* 1998).

EQUIPO:

- Refrigerador
- Centrifuga
- Termoblock
- Microcentrifuga

MATERIAL:

- Guantes desechables
- Cubrebocas
- Gasas
- ➣ Tubos de 15ml
- Tubos Eppendorf de 2.0 y 1.5 ml
- Pipeta graduable de 100 y 1000 μl
- Puntillas de 100 y 1000 µI

REACTIVOS:

- Solución de lisis de critrocitos
- Solución DTAB 8%
- Solución CTAB 5%
- Cloreformo 100%
- NaCLL2 M.
- ➤ Etanol 100%
- Etanol 70%
- Agua invectable

PROCEDIMIENTO:

- Tomar 5-10 ml de sangre periférica por punción venosa en un tubo con EDTA.
- Vaciar la sangre total a un tubo de 15 mL, agregar 10 ml de Solución de Lisis de Eritrocitos y se lleva a refrigeración durante 20 min; se centrifuga a 4000 rpm durante 25 min.
- 3. Se descarta el sobrenadante y se obtiene el botón celular.
- 4. El botón celular se transfiere a un tubo Eppendorf de 2 ml.
- Al tubo con el botón celular se le agregan 600 µl de Solución DTAB y se lleva a 65-68 °C durante 5
- Al tubo se le adiciona 900µl de eloroformo al 100%, se agita vigorosamente. Se centrifuga a 12 000
 rom durante 7 min.
- Se obtiene el sobrenadante y se transfiere a otro tubo. (Se desecha el botón celular y el cloroformo precipitados).
- Al sobrenadante se le agrega 100 µl de CTAB al 5% y se agitan suavemente (8-10 veces), posteriormente se agrega 900µl de agua de solución invectable, y se agita suavemente. (Se precipita el DNA).
- 9. Se centrifuga a 10 000 rpm durante 5 min.
- Se descarta el sobrenadante y se agrega 150 μl de NaCl 1.2 M y 750 μl de etanol 100% frio y se mezela suavemente.
 - Se centrifuga a 10 000rpm durante 5 min.
- 11. Se descarta el sobrenadante y se agrega 1ml de etanol al 70% y se centrifuga a 10 000 rpm durante 5 min (este paso se realiza dos veces).
- Se descarta el sobrenadante y se deja evaporar el exceso de etanol a temperatura ambiente hasta que el botón de DNA quede completamente seco.
- 13. Se resuspende el DNA en 100µl de TE y se incuba a 65°C durante 1 hr.
- 14. Se determina la concentración y la calidad del DNA por espectofotometria y electroforesis en gel de agarosa 1%.
- 15. Se almacena el DNA a -20°C.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Solución para la obtención de leucocitos (lisis de eritrocitos):

NH ₄ HCO ₃	PM 79.06 g	0.01 M	0.7906 g/11.
NH ₄ CI	PM 53.49 g	0,144 M	7.70256 g/H.

Disolver en agua desmineralizada estéril y aforar a 1 000 ml.

Buffer de lisis DTAB

DTAB		8%	8 g/0.1L	
Tris	PM 121.1 g	0.1M, pH 8.6	1.21 g/0.1L	
NaCl	PM 58.44 g	1.2 M	7 g/0.1L	
EDTA	PM 372.2 g	0.5 M	1.86/0.1L	

Disolver el tris y ajustar el pH de 8.6 con FICI en ¾ del volumen final, adicionar el DTAB, el NaCl, el EDTA y afotara a 1 000 ml.

Buffer CTAB

CTAB		5%	5 g/0.1L
NaCl	PM 58.44g	0.4 M	2.34 g/0.1L

Disolver ambas sales en agua desmineralizada estéril y aforar a 1 000 ml.

Solución NaCl 1.2 M

NaCl	PM 58.44 g	1.2 M	7 g/0.1L
	•		~

Disolver la sal en agua desmineralizada estéril y aforar a 100 ml.

Buffer TF

Tris	PM 121.1 g	0.01 M, pH 8	0.121 g/0.1L
EDTA	PM 372.2 g	0.001 M	0,01286 g/0.1L

Disolver el Tris y ajustar a pH 8 con HCl en ¼ del volumen final, adicionar el EDTA, aforar a 1 000 ml.

Cuantificación de DNA genómico

Fundamento: Para cuantificar la cantidad de DNA genómico y verificar su pureza se determina la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm. Si la relación de DO 260/280 nm es mayor de 2.0 el DNA tiene una pureza adecuada, mientras que si esta relación es menor de 2.0 se debe considerar contaminación de la muestra, principalmente por proteínas (Sambrook y Russell 2001).

En la determinación de la concentración de DNA se debe considerar la siguiente fórmula:

DNA ng/mL=DO 260 nm x dilución (1005/5µL) x 50 (factor constante)

Notas

50 es el valor del coeficiente de extinción molar de 50 ng/mL que tiene la máxima absorbancia de 1.0 unidad de DO a 260 nm.

El factor de dilución se refiere al volumen total de la celdilla entre el volumen de muestra

EQUIPO

Espectrofotómetro.

MATERIAL.

- Celdilla de cuarzo de 1ml
- Pipeta graduable (2ul v 1000µl)
- Puntas desechables (10ul y 10000ul)
- ≽ Gasas
- Parafilm

REACTIVOS

- Agua invectable
- > DNA

PROCEDIMIENTO

- Encender el espectrofotómetro con 20 minutos de anticipación por tener una lámpara de UV, utilizar programa para ácidos nucleicos de doble cadena.
- Ajustar a cero el espectro con el blanco de reacción, midiendo 1000 μl de agua inyectable en la celdilla de cuarzo.
- Colocar 5 µl de la muestra de DNA en la celdilla donde es leido el blanco de agua, tapar la celdilla con parafilm e invertir la solución alrededor de 30 veces procurando que se homogénise la solución. Leer la muestra a 260 nm y 280 nm.
- Si hay más de 1 muestra se repiten los pasos 2 y 3 para leer cada muestra, cuidando de enjuagar y secar perfectamente bien la celdilla de cuarzo después de leer cada muestra.
- Se utilizan las lecturas de densidad óptica a 260 nm para calcular la cantidad de DNA y a 280 nm para determinar su pureza.

Amplificación por PCR

Fundamento: La técnica utilizada para la síntesis in vitro de ácidos nucleicos conocida como PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reactions) es un proceso iterativo que consiste en tres elementos:

- Desnaturalización de la cadena molde por calor
- Hibridación de los cebadores oligonucleotídicos a una secuencia díana de cadena sencilla.
- Extensión del alineamiento de los cebadores por una DNA polimerasa termoestable. (Sambrook y Russell 2001).

Las condiciones para la reacción del polímorfismo rs669: A>G se describen en el siguiente cuadro. El volumen final de la reacción es 25µl por muestra.

Reactivos	Concentración	Concentración final	µl por reacción
	ínicial		
Buffer	10X	1X	2.5
A2M_F	20.59 nM	10 pM	J
A2M_R	22.29 nM	10 pM	l
Cocktel dNTPs	100 mM c/u	200 mM	0.5
(ATP, TTP, GTP, CTP)			
Cloruro de magnesio	$50~\mathrm{mM}$	1.5 mM	0.75
Taq polimerasa	5 U/µ1	2 Ն/ա	0.4
DNAg	$300~{\rm ng/\mu l}$	100 ng/µl	0.5
			18.35

Condiciones de la reacción para la PCR. El volumen final de la reacción es 25ul por muestra.

CONDICIONES DE LA REACCIÓN		
	Precalentamiento	
	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización	5 min	94 C
Ciclos	30	
Desnaturalización	20 seg	94 · C
Alineación	15 seg	62 C
Extension	20 seg	72° C
Extensión final	5 min	72° C

Digestión con enzimas de restricción

Fundamento: La detección del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (restriction fragment lenght polymorphism) es el método más comúnmente utilizado para analizar la presencia de variantes con secuencias conocidas. Un segmento de DNA en el cual se busen una mutación es amplificado mediante PCR y posteriormente es digerido con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen una secuencia específica, al unirse cortan la secuencia de DNA cambiando el patrón (peso molecular) de los fragmentos de DNA que posteriormente se observan con electroforesis en un gel de poliacrilamida (Nakashima et al. 2003)

Las condiciones de reacción para el polimorfismo se describen a continuación. La enzima trabaja con una temperatura de 37 durante 16h. para su incubación,

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	μl por reacción
Buffer NEBuffer 3	10X	IX	1
Mbol	10 U/μl	10 U/µ1	I
Agua			4
Producto amplificado			4

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Fundamento: La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en la electroforesis en gel. es quimicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y permite buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro que se utilizara en la preparación del gel. la cual es determinada por el tamaño de los fragmentos esperados (Garcia Pérez, 2000).

Los geles de poliacrilamida poseen las siguientes ventajas importantes sobre los geles de agarosa (Sambrook y Russell 2001):

- Su poder de resolución es tan grande que puede separa moléculas de de DNA, cuya longitud se diferencia por lo menos en 0.1% (es decir 1pb en 1000pb)
- Pueden albergar cantidades mucho mayores de DNA que los geles de agarosa. Hasta 10µg de DNA se puede aplicar en una sola ranura (1cm x 1mm) de un gel típico de poliacrilamida sin una pérdida significativa de resolución.
- El DNA recuperado de los geles de de poliacrilamida es extremadamente puro y puede ser usado en la mayoría de los propósitos exigentes

EOUIPO

- Câmara de electroforesis vertical
- Fuente de poder

MATERIAL

- Para el molde del gel se necesita: 2 placas de cristal, 1 liga, 2 separadores de plástico de 6mm y pinzas
- Ipeine de plástico de 6 mm, para hacer los pozos del gel
- Guantes desechables
- ≽ Gasas
- Pipetas de volumen variable 100 y 1000µl

REACTIVOS

- > TBE IX
- ➤ TBE 10X
- Acrilamida 29:1
- Persulfato de amonio
- ➢ TEMED
- Amortiguador de carga

PROCEDIMIENTO

- 1. Montar gel
- Limpiar las placas de cristal con etanol y una gasa.
- En la placa de cristal con las esquinas redondas se coloca la liga con la parte abultada hacia arriba del cristal, dejando descubiertas las esquinas
- > Se coloca encima el cristal que contiene el corte donde embona el peine
- Se colocan los separadores a los lados entre los cristales tratando de no dejar espacio entre los separadores y la liga
- Se colocan pinzas en los extremos de los cristales excepto donde está el corte para que embone el peine, esto para sujetar el molde.
- 2. Preparar una solución de piliacrilamida 29:1 al 6 % para 30 ml. En un tubo de 50 ml colocar:

7	Agua	22.5 ml
7	Acrilamida	4.5 ml
>	TBE 10X	3 ml
7	Persulfato de amonio	375 µl
۲	TEMED	37.5 µl

- Mezela bien la preparación anterior, vaciar de forma rápida al molde teniendo cuidado de no formar burbujas, colocar el peine teniendo de igual manera, la precaución de no formar burbujas, esperar a que polimerice.
- Una vez que el gel ha polimerizado, se retiran las pinzas, la liga y el peine, teniendo cuidado de romper los pozos, con la avuda de una ieringa y buffer 1X se retira el exceso de poliacrilamida.
- 5. Añadir solución de buffer TBE 1X en la parte de baja de la cámara de electroforesis, colocar el gel en forma vertical teniendo cuidado de que no se formen burbujas entre el gel y el buffer, el gel se sostiene a la parte superior de la cámara con un par de pinzas.
- Se agrega buffer TBE 1X en la parte superior de la cámara de manera que los pozos que se formaron con el peinen queden completamente cubiertos con este.
- En papel parafilm se colocan gotitas de buffer cargador de 1 µl aproximadamente se que mezclan con 10 microlitros de la muestra de DNA, y la mezcla se coloca en un pozo.
- Colocas las tapas y los cables de corriente los conectas a la fuente de poder, el corrimiento se realiza a 200 volts 1 hr.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Acrilamida 29:1

Acrilamida	38.7 g
Bisacrilamida	1.3 g

En vaso de precipitado colocar aproximadamente 30 ml de agua desmineralizada y este colocarlo en la plancha, se prende la plancha y se le agrega una mosca al vaso, se agrega poco a poco la acrilamida, posteriormente se le agrega la bisacrilamida y finalmente se afora 100 ml

Persulfato de amonio

Persulfato de amonio	10 %	10 g/0.1L
Disolver la sal en agua desr	nineralizada y aforar a	10 ml

Buffer TBE 10X:

EDTA	PM 372.2 gr	0.02 M	40 ml de sol 5 M/1L
Tris	PM 121.1 g	0.89 M	108.8 g/1L
Ácido Borico	PM 61.844 g	0,89 M	55.04 g/1L

Disolver las sales en agua desmineralizada y aforar a 11.

Buffer cargador

Azul de bromofenol	0.25 %	25 mg/10ml
Xilencianol	0.25 %	25 mg/10ml
Glicerol	30 %	3 ml/10ml

Mezelar ambos colorantes con el glicerol y aforar a 10 ml con agua desionizada

Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Fundamento: Existen diferentes tipos de tinción, entre ellos la de plata la cual es una técnica muy sensible, que detecta desde 15pg por banda. El gel es tratado con sales de plata que por su carga positiva son atraidas por la carga negativa de los fragmentos de DNA y posee la característica de producir coloración negra o carmelita, esto debido a la reducción de los iones de plata (Sambrook y Russell 2001).

MATERIAL.

- Charola de plástico
- Bolsa de plástico

REACTIVOS

- Solución fijadora
- Solución de tinción
- Solución reveladora.

PROCEDIMIENTO

- 1. Retirar el gel de la cámara de electroforesis
- Colocar el gel en la charola de plástico, agregar solución fijadora suficiente para cubrir el gel, y
 agitar por 10 min (pasado el tiempo decantar)
- 3. Adicionar la solución de tinción, agitar 5 min (decantar)
- Realizar I lavado con agua bidestilada y decantar
- 5. Agregar un poco de solución reveladora para eliminar el exceso de solución de tinción y decantar
- Agregar solución reveladora y agitar hasta que las bandas sean visibles, decantar la solución y realizar un lavado con agua bidestilada
- 7. Guardar el gel en una bolsa de plástico.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución Fijadora

Etanol	10 %	100 m]/1L
Acido Acético	0.5 %	5 ml/11.

En un matraz colocar agua desmineralizada, agregar el etanol y el acido acético, aforar a 1L.

Solución de tinción

,			
Nitrato de plata	0.2 %	2 a/H	
ivitrato de mata	V.4.76	2 9/1 L	
	•	٠. ب	

Preparar II de solución fijadora, agregar el nitrato de plata, mesclar bien y colocar en un frasco obscuro.

Solución reveladora

NaOH	3 %	30 g/11.
Formaldehido	0.5 %	5 ml/1L

Colocar agua desmineralizada en un matraz de 1L agregar las lentejas, agitar hasta que se disuelvan, posteriormente agregar el formaldehido y finalmente aforar a 1L.

